

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年 10 月 6 日 (06.10.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/092393 A1

- (51) 国際特許分類⁷: A61K 48/00, 31/7105, 31/711, 35/76, A61P 35/00, 35/02
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2005/005790
- (22) 国際出願日: 2005 年 3 月 28 日 (28.03.2005)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2004-096877 2004 年 3 月 29 日 (29.03.2004) JP
- (71) 出願人 および
- (72) 発明者: 杉山 治夫 (SUGIYAMA, Haruo) [JP/JP]; 〒5620036 大阪府箕面市船場西 2-19-30 Osaka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 尾路 祐介 (OJI, Yusuke) [JP/JP]; 〒5640051 大阪府吹田市豊津町 1-14-1004 Osaka (JP).
- (74) 代理人: 清水 初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒3000847 茨城県土浦市卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階 Ibaraki (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: MICRO RNA INHIBITING THE EXPRESSION OF WT1 GENE AND UTILIZATION OF THE SAME

(54) 発明の名称: WT1 遺伝子の発現を抑制するマイクロ RNA およびその利用

(57) Abstract: It is found out that a miRNA targeting the vicinity of the stop codon of WT1 gene not only inhibits the expression of the WT1 gene but also shows a remarkable effect of inhibiting the cell proliferation of a cancer cell line.

(57) 要約: WT1 遺伝子のストップコドン近傍を標的とする miRNA が WT1 遺伝子の発現を抑制するのみならず、顕著に癌細胞株の細胞増殖抑制効果を示すことを見出した。



WO 2005/092393 A1

明 細 書

WT1遺伝子の発現を抑制するマイクロRNAおよびその利用 技術分野

[0001] 本発明は、WT1遺伝子の発現を抑制するマイクロRNAおよびその利用に関する。
特に本発明は、該マイクロRNAを利用した細胞増殖の抑制に関する。

背景技術

[0002] ウイルムス腫瘍遺伝子(WT1遺伝子)は、ジンクフィンガー型の転写因子をコードする遺伝子である。WT1は、WT1遺伝子に存在する2か所のalternative splicing部位のうちの5'側の部位に挿入された17個のアミノ酸(17AA)の有無とジンクフィンガー3-4間の3アミノ酸残基の有無によって区別される、4つのアイソフォームの存在が知られている。

[0003] ウイルムス腫瘍遺伝子(WT1遺伝子)は、小児腎腫瘍の原因遺伝子として単離された(非特許文献1、2)。ウイルス腫瘍でこの遺伝子の欠損や突然変異が見つかったこと等から、従来は癌抑制遺伝子と考えられてきた。

[0004] しかし、本発明者らによる数々の報告は、WT1遺伝子は癌抑制遺伝子というより、むしろ癌遺伝子様の機能を果たしていることを示唆している。変異のない野生型WT1遺伝子がほとんどすべての白血病細胞で高発現され、その発現レベルは白血病患者の予後と逆相関を示すこと(非特許文献3、4)、WT1アンチセンスDNAにより白血病細胞の増殖が特異的に抑制されること(非特許文献5)、マウス正常骨髄系前駆細胞および骨髄系前駆細胞株32D C13はWT1遺伝子の強制発現により好中球への分化が抑制され、増殖するようになること(非特許文献6)、等が明らかとなった。これらの知見は、WT1遺伝子は、造血系細胞の白血病化に関与していることを示すものである。また本発明者らは、野生型WT1遺伝子が種々の固形癌においても高発現していることを報告してきた(非特許文献7-14)。

[0005] そこで本発明者らは、WT1遺伝子の発現を効率よく抑制することができれば、腫瘍特異的分子標的療法の開発につながると考えた。これまでに、WT1を標的とした腫瘍特異的分子標的療法の例は知られていない。

- [0006] 非特許文献1:Call KM, et al : Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. Cell 60 : 509, 1990
- 非特許文献2:Gessler M, et al : Homozygous deletion in Wilms tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping. Nature 343 '. 774, 1990
- 非特許文献3:Inoue K, et al : WT1 as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia. Blood 84 : 3071, 1994
- 非特許文献4:Inoue K, et al : Aberrant overexpression of the Wilms tumor gene (WT1) in human leukemia. Blood 89 : 1405, 1997
- 非特許文献5:Yamagami T, Sugiyama H, Inoue K, Ogawa H, Tatekawa T, Hirata M, Kudoh T, Akiyama T, Murakami A, Maekawa T. Growth inhibition of human leukemic cells by WT1 (Wilms tumor gene) antisense oligodeoxynucleotides: implications for the involvement of WT1 in leukemogenesis. Blood. 1996 Apr 1;87(7):2878-84.
- 非特許文献6:Inoue K, et al:Wilms'tumor gene (WT1) competes with differentiation —inducing signal in hematopoietic progenitor cells. Blood 91:2969, 1998
- 非特許文献7:Oji, Y., Ogawa, H., Tamaki, H., Oka, Y., Tsuboi, A., Kim, E.H., Soma, T., Tatekawa, T., Kawakami, M., Asada, M., Kishimoto, T., and Sugiyama, H. Expression of the Wilms' tumor gene WT1 in solid tumors and its involvement in tumor cell growth. Japanese Journal of Cancer Research, 90: 194-204, 1999.
- 非特許文献8:Oji, Y., Miyoshi, S., Maeda, H., Hayashi, S., Tamaki, H., Nakatsuka, S., Yao, M., Takahashi, E., Nakano, Y., Hirabayashi, H., Shintani, Y., Oka, Y., Tsuboi, A., Hosen, N., Asada, M., Fujioka, T., Murakami, M., Kanato, K., Motomura, M., Kim, E.H., Kawakami, M., Ikegame, K., Ogawa, H., Aozasa, K., Kawase, I., and Sugiyama, H. : Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in de novo lung cancers. International Journal of Cancer, 100: 304-308, 2002.
- 非特許文献9:Ueda, T., Oji, Y., Naka, N., Nakano, Y., Takahashi, E., Koga, S., Asada, M., Ikeba, A., Nakatsuka, S., Abeno, S., Hosen, N., Tomita, Y., Aozasa, K.,

Tamai, N., Myoui, A., Yoshikawa, H., and Sugiyama, H. : Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in human bone and soft-tissue sarcomas. *Cancer Science*, 94: 271-276, 2003.

非特許文献10: Oji, Y., Inohara, H., Nakazawa, M., Nakano, Y., Akahani, S., Nakatusuka, S., Koga, S., Abeno, S., Honjo, Y., Yamamoto, Y., Iwai, S., Yoshida, K., Oka, Y., Ogawa, H., Yoshida, J., Aozasa, K., Kubo, T., and Sugiyama, H. : Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Science*, 94: 523-529, 2003.

非特許文献11: Oji, Y., Miyoshi, Y., Koga, S., Nakano, Y., Ando, A., Nakatuska, S., Ikeba, A., Takahashi, E., Sakaguchi, N., Yokota, A., Hosen, N., Ikegame, K., Kawakami, M., Tsuboi, A., Oka, Y., Ogawa, H., Aozasa, K., Noguchi, S., and Sugiyama, H. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in primary thyroid cancer. *Cancer Science*, 94: 606-611, 2003.

非特許文献12: Oji, Y., Yamamoto, H., Nomura, M., Nakano, Y., Ikeba, A., Nakatsuka, S., Abeno, S., Kiyotoh, E., Jomgeow, T., Sekimoto, M., Nezu, R., Yoshikawa, Y., Inoue, Y., Hosen, N., Kawakami, M., Tsuboi, A., Oka, Y., Ogawa, H., Souda, S., Aozasa, K., Monden, M., and Sugiyama, H. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in colorectal adenocarcinoma. *Cancer Science*, 94: 712-717, 2003.

非特許文献13: Oji, Y., Miyoshi, S., Takahashi, E., Koga, S., Nakano, Y., Shintani, Y., Hirabayashi, H., Matsumura, A., Iuchi, K., Ito, K., Kishimoto, Y., Tsuboi, A., Ikegame, K., Hosen, N., Oka, Y., Ogawa, H., Maeda, H., Hayashi, S., Kawase, I., and Sugiyama, H. Absence of mutations in the Wilms' tumor gene WT1 in de novo non-small cell lung cancers. *Neoplasma*, 51:17-20, 2004.

非特許文献14: Oji, Y., Miyoshi, Y., Kiyotoh, E., Koga, S., Nakano, Y., Ando, A., Hosen, N., Tsuboi, A., Kawakami, M., Ikegame, K., Oka, Y., Ogawa, H., Noguchi, S., and Sugiyama, H. Absence of mutations in the Wilms' tumor gene WT1 in primary breast cancer. *Jpn J Clin Oncol*, 34:74-7, 2004.

非特許文献15:実験医学 Vol.22 No.4 (3月号) 494-499, 2004

非特許文献16:Oji Y, Suzuki T, Nakano Y, Maruno M, Nakatsuka S, Jomgeow T, Abeno S, Tatsumi N, Yokota A, Aoyagi S, Nakazawa T, Ito K, Kanato K, Shirakata T, Nishida S, Hosen N, Kawakami M, Tsuboi A, Oka Y, Aozasa K, Yoshimine T, Sugiyama H : Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in primary astrocytic tumors. Cancer Sci. 95:822-7,2004.

非特許文献17:Oji Y, Yano M, Nakano Y, Abeno S, Nakatsuka S, Ikeba A, Yasuda T, Fujiwara Y, Takiguchi S, Yamamoto H, Fujita S, Kanato K, Ito K, Jomgeow T, Kawakami M, Tsuboi A, Shirakata T, Nishida S, Hosen N, Oka Y, Aozasa K, Monden M, Sugiyama H. : Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in esophageal cancer. Anticancer Res. 24:3103-8, 2004.

非特許文献18:Oji Y, Nakamori S, Fujikawa M, Nakatsuka S, Yokota A, Tatsumi N, Abeno S, Ikeba A, Takashima S, Tsujie M, Yamamoto H, Sakon M, Nezu R, Kawano K, Nishida S, Ikegame K, Kawakami M, Tsuboi A, Oka Y, Yoshikawa K, Aozasa K, Monden M, Sugiyama H. : Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in pancreatic ductal adenocarcinoma. Cancer Sci. 95:583-7,2004.

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0007] 本発明は、WT1遺伝子の発現を効率的に抑制することができる分子を提供すると共に、該分子を利用して細胞増殖を抑制することを課題とする。WT1遺伝子の発現を抑制する分子として、特に本発明は、マイクロRNAを提供する。

課題を解決するための手段

- [0008] 本発明者らは、上記課題を解決すべく、マイクロRNAを癌細胞に作用させてWT1の発現を抑制することを考えた。WT1 mRNAの配列に対しマイクロRNAとして働きうる可能性のあるマイクロRNAをデータベースから検索し、候補としてmicroRNA (miR) 115を選択した。マイクロRNAは、標的mRNAと不完全にしか結合しないため、標的を同定することは現在の技術状況下において容易ではない(非特許文献15)。しかし、鋭意努力の結果、本発明者らはWT1遺伝子を標的とするマイクロRNAがWT1遺伝子の

発現を抑制するのみならず、顕著に癌細胞株の細胞増殖抑制効果を示すことを見出した。また、miR115がWT1mRNAの仮想標的配列を介してWT1タンパク質の発現を抑制していることを、GFPタンパクの3'側に仮想標的配列を挿入したベクターを構築し、GFPタンパクの細胞内での発現に対するmiR115の効果を解析することにより証明した。すなわち、本発明はWT1を標的とするマイクロRNAによる細胞増殖抑制に関し、より具体的には、下記の発明を提供するものである。

[1] 以下の(a)から(c)のいずれかを有効成分として含有する、細胞増殖抑制剤

(a) WT1遺伝子の転写産物に相補的な一本鎖RNA

(b) (a)のRNAをコードするDNA

(c) (b)のDNAが挿入されたベクター

[2] 一本鎖RNAが、WT1遺伝子の転写産物における配列番号:1に記載の塩基配列に相補的である、[1]に記載の細胞増殖抑制剤

[3] 一本鎖RNAが、配列番号:2に記載の塩基配列からなるRNAである、[1]または[2]に記載の細胞増殖抑制剤

[4] 以下の(a)から(c)のいずれかを有効成分として含有する細胞分化誘導剤または細胞死誘導剤。

(a) WT1遺伝子の転写産物に相補的なRNAと該RNAに相補的なRNAとを含む二重鎖RNA

(b) (a)の二重鎖RNAをコードするDNA

(c) (b)のDNAが挿入されたベクター

[5] 一本鎖RNAが、WT1遺伝子の転写産物における配列番号:1に記載の塩基配列に相補的である、[4]に記載の薬剤。

[6] 一本鎖RNAが、配列番号:2に記載の塩基配列からなるRNAである、[4]または[5]に記載の薬剤。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]ヒトmiR-115(配列番号:2)とWT1 mRNAにおけるその標的領域(配列番号:1)との相補性を示す図である。

[図2]miR-115によるAZ-521細胞に対する増殖抑制効果の経時的変化を示す図であ

る。

[図3]miR-115によるAZ-521細胞に対する増殖抑制効果の濃度依存性を示す図である。

[図4]miR-115によるWT1タンパク質発現抑制を示す写真である。

[図5]WT1の強制発現によりmiR-115のAZ-521細胞に対する増殖抑制効果がブロックされたことを示す図である。

[図6]miR115仮想標的配列を挿入したGFP発現ベクターの構造を示す図である。

[図7]miR115仮想標的配列を介したmiR115のGFPタンパク質の抑制を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

[0010] 本発明は、WT1遺伝子転写産物に結合するマイクロRNAに関する。一般的にマイクロRNAは、小さなnon-coding RNAで、mRNA配列に作用して遺伝子サイレンシングを引き起こすRNAとして捉えられている。マイクロRNA (miRNA) は、1993年Amborosらのグループによって最初に報告された。Amborosらは、線虫のlin-4というNon-coding RNAがlin-14あるいはlin-28という遺伝子の発現を、3'-UTR領域に結合することにより、翻訳段階で抑制することを報告した。その後、線虫のmiRNAとして21塩基からなるlet-7が報告された。let-7に関する研究からは、一種類のmiRNAが複数の標的mRNAを制御している可能性があることが示唆されている。現在ではmiRNAが動植物に広く分布していることがわかっており、300種類以上が報告されている。

[0011] miRNAの発現過程と機能は以下のように考えられている。miRNAをコードする遺伝子から、数十から数百塩基の前駆体RNAが転写される。前駆体RNAは、核内でリボヌクレアーゼによってpre-miRNAと呼ばれるステムループ型RNAにプロセシングされる。pre-miRNAは輸送タンパク質と複合体を形成して核外に輸送された後、Dicerによってプロセシングされ、成熟した機能性のmiRNAとなる。成熟したmiRNAはタンパク質複合体miRNPに取り込まれる。このmiRNP複合体が部分的に相補性を有する標的mRNAと結合して翻訳抑制に働くと考えられている。またmiRNAの中には、特定のmRNA配列と完全な相補性を持ち、siRNAとして機能するmiRNAが存在することが報告されている。通常のmiRNAが翻訳阻害により遺伝子発現を抑制するのに対し、この

miRNAはsiRNAと同様に標的mRNA配列を配列特異的切断によって遺伝子発現を抑制すると考えられている。

[0012] 本発明のマイクロRNAは、標的であるWT1遺伝子の転写産物と相補的な一本鎖RNAである。本発明における相補的とは、必ずしも完全に相補的であることを意味しない。本発明のマイクロRNAと標的であるWT遺伝子の転写産物との結合において、ミスマッチ(対応する塩基が相補的でない)、バルジ(一方の鎖に対応する塩基がない)などにより不対合部分が含まれていてもよい(図1参照)。

[0013] 本発明のマイクロRNAの標的となるWT1遺伝子の転写産物の配列は、マイクロRNAが結合することにより遺伝子発現抑制効果を示しうる限り、特に制限はない。標的配列の好ましい一例としては、配列番号:1の配列を挙げることができる。配列番号:1の配列は、ストップコドン直前の部位で、WT1遺伝子4種のアイソフォームに共通である。WT1遺伝子のアイソフォームの一つを配列番号:3に示した。配列番号:1の標的配列は、配列番号:3に示したWT1遺伝子配列中では第1723位から第1739位に存在し、ストップコドンは第1738位から第1740位に存在する。なお、開始コドンは第391位から第393位に存在する。

[0014] 本実施例においては、配列番号:1に記載の塩基配列を標的とするマイクロRNAとしてmiR-115を用いた。miR-115の塩基配列を、配列番号:2に示す。miR-115は、Dreyfussらによって、構成タンパク質eIF2C,Gemin3,Gemin4、と共にタンパク質複合体miRNP(ribonucleoprotein)を形成するマイクロRNAの一つとして同定された。Gemin3,Gemin4は、Gemin2,Gemin5と共に脊髄性筋萎縮症の原因タンパク質Survival of Motor Neuron (SMN)とSMN複合体を形成することが知られている。NCBI GenBankでのmiR-115の番号はAF480513 である。

[0015] 本発明のマイクロRNAは、WT1遺伝子の発現を抑制する効果を有する限り、その長さを問わないが、好ましくは25塩基以下である。より好ましくは14-18塩基、最も好ましくは16塩基である。

[0016] 本発明のmiRNAから3'-UTR領域に存在する配列の塩基配列を基に標的となる配列を選択し、調製することができる。

本発明のmiRNAは、WT1遺伝子の転写産物の塩基配列を基に標的となる配列を

選択し、化学的合成方法等によって、適宜調製することができる。

[0017] 本発明のmiRNAは、そのまま生体に投与することもできる。また、miRNAをコードするDNAを生体内に投与して、生体内でmiRNAを発現させることもできる。生体内でmiRNAを発現させる場合には、例えば、レトロウイルス、アデノウイルス、センダイウイルスなどのウイルスベクターやリポソームなどの非ウイルスベクターを利用することができる。投与方法としては、例えばin vivo法およびex vivo法を挙げることができる。

[0018] 本発明のmiRNA、該miRNAをコードするDNA、該DNAが挿入されたベクターは、適宜配合剤と混合して細胞増殖抑制剤、細胞分化誘導剤または細胞死誘導剤として使用することができる。該薬剤を公知トランスフェクション試薬等を用いて細胞に導入すれば、WT1転写物の翻訳阻害、またはWT1転写物の切断によって細胞増殖抑制、細胞分化誘導、または細胞死誘導等の効果を発現できる。本発明による薬剤の効果が期待される細胞は、WT1遺伝子を発現する細胞である。癌細胞にはWT1遺伝子が高発現している。WT1が高発現する癌細胞の例として、具体的には、ヒトの白血病、大腸癌、肺癌、乳癌、頭頸部扁平上皮癌、食道癌、胃癌、甲状腺癌、骨および軟部肉腫、卵巣癌、子宮癌、腎癌、膀胱癌、またはグリオブラストーマを例示することができる。一方、正常細胞にはWT1はごくわずかししか発現しない。したがって、本発明による薬剤は、学術研究用としてのみならず、ヒトおよびその他の哺乳動物の癌治療用医薬品、特に上記に列挙した癌を対象とする癌治療用医薬品として有効と考えられる。本発明の癌治療用医薬品は、癌細胞に特異的に働き、正常細胞の損傷が少ない医薬品として有効と考えられる。

[0019] 本発明の薬剤の調製においては、薬学上許容される配合剤を混合することができる。薬学上許容される配合剤として、例えば界面活性剤、賦形剤、着色料、着香料、保存料、安定剤、緩衝剤、懸濁剤、等張化剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、流動性促進剤、矯味剤等が挙げられるが、これらに制限されず、その他常用の担体を適宜使用することができる。上記製剤の剤型の種類としては、例えば経口剤として錠剤、粉末剤、丸剤、散剤、顆粒剤、細粒剤、軟・硬カプセル剤、フィルムコーティング剤、ペレット剤、舌下剤、ペースト剤等、非経口剤として注射剤、坐剤、経皮剤、軟膏剤、硬膏剤、外用液剤等が挙げられ、当業者においては投与経路や投与対象等に応じた

最適の剤型を選ぶことができる。

なお本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

実施例

[0020] 以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もともと、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

[0021] [実施例1] microRNAの選択

WT1 mRNAのstop codon直前から3'UTRの配列に対しmicroRNAとして働きうる可能性のあるmicroRNAをデータベース(NCBI GenBank)から検索し、候補としてmicroRNA (miR) 115を選択した。

[0022] [実施例2] microRNAの調製

RNAを日本バイオサービスに依頼し合成した。これを100 μ Mの濃度でRNAse free waterに溶解して分注し、使用するまで-80°Cで凍結保存した。合成したRNAの配列を以下に記す。mir-115: 5' -uga agc gga gcu gga a-3' (配列番号:2)
Luciferase AS 5' -ucg aag uau ucc gcg uac guu -3' (配列番号:4)。

[0023] [実施例3] miR-115によるAZ-521細胞の増殖抑制

WT1遺伝子を高発現するgastric cancer cell line AZ-521細胞をFBS10%含Dulbecco's Modified Medium (DMEM)中で培養した。microRNAによる細胞の処理は、トリプシナイズしたAZ-521細胞を 1.2×10^5 cells/2mlに調製後、6well plateにまき24時間後にRNA(final conc.2 μ M)をRNAi Fect(QIAGEN)を用いて細胞に導入した。細胞数はトリプシナイズした後、算定板を用いて算定した。

[0024] AZ-521細胞をmiR-115 (final conc.2 μ M)で処理すると、コントロールのRNAで処理したときに比べ有意にAZ-521細胞の増殖を抑制した(図2)。次にmiR-115の濃度を0.5,1.0および2.0 μ Mに変え48時間処理し、miR-115の細胞増殖抑制効果を解析したところ、この効果はmiR-115の濃度に依存していた(図3)。

[0025] [実施例4] miR-115によるWT1タンパクの発現抑制

上記実施例3と同様に培養、トリプシナイズしたAZ-521を 1.2×10^5 cells/2mlに調製後6well plateにまき、24時間後にRNAi Fect (QIAGEN)存在下でmiR-115または

Luciferase AS (濃度 $2\mu\text{M}$) で12時間処理した。

- [0026] これらの細胞におけるWT1タンパクの発現をWestern Blotで解析した。細胞をトリプシナイズしPBSにて2回洗浄後、 $10^6\text{cells}/100\mu\text{l}$ の割合でLaemmli's SDS sample bufferに溶解した。タンパクをSDS-PAGEにより分離した後PVDF膜に転写、1% gelatin/TBSTでブロッキングした。これを1次抗体anti WT1 C-19 Ab (Santa Cruz Biotechnology 100:1希釈)またはanti GAPDH Ab (1000:1希釈)と反応させた後、それぞれに対するALP標識2次抗体を反応させBCIP/NBT kit (ナカライテスク)を用いてWT1 及びGAPDHタンパクを検出した。

結果を図4に示す。miR-115処理により細胞内でのタンパクの発現が効率よく抑制されていた。

- [0027] [実施例5] WT1の強制発現によるmiR-115の効果の抑制

miR-115がWT1特異的にAZ-521細胞の増殖を抑制しているかどうかを確認するため、WT1を強制発現させたAZ-521細胞をmiR-115で処理し、WT1発現抑制効果を検討した。

強制発現用として、CMVプロモーターを持つ発現ベクターpcDNA3.1 (Invitrogen) にWT1 17AA(+)KTS(+)を挿入したベクターpcDNAWT1A(+ /+)を作製した。AZ-521細胞への導入はvector $2\mu\text{g}$ をFugene6 (Roche)を用いてLipofection した。

- [0028] AZ-521細胞をまき、24時間後にRNA (終濃度 $2\mu\text{M}$) をRNAiFect (QIAGEN)を用いて細胞に導入した。24時間後にpcDNA3.1/WT1A(+ /+)またはempty vector $2\mu\text{g}$ をLipofectionし72時間後にそれぞれの細胞を回収し算定した。細胞数はトリプシナイズした後、算定板を用いて算定した。

- [0029] pcDNA3.1/WT1A(+ /+)を導入した細胞においてempty vectorを導入した細胞に比較して有意にmiR-115の細胞増殖抑制効果が抑制されていた(図5)。これらの結果はmiR-115が特異的にWT1タンパクの発現を抑制することによりAZ-521細胞の増殖を抑制していることを示す。

- [0030] [実施例6] miR115仮想標的配列を介したmiR115のGFPタンパク質の抑制

miR115がWT1mRNAの仮想標的配列を介してWT1タンパクの発現を抑制していることを証明するために、GFPタンパクの3'側にmiR115の仮想標的配列を挿入した

ベクターを構築し、GFPタンパクの細胞内での発現に対するmiR115の効果を解析した。

- [0031] まず、WT1遺伝子の終止コドン上流17塩基(2072nt - 2088nt、配列番号:1)の配列(miR115の仮想標的配列)を3回繰り返すオリゴDNA、またその5ヶ所に変異をもたせた塩基配列(配列番号:5)を5回繰り返すオリゴDNAをそれぞれpEGFP-c3 vector (BD)のScaI、EcoRIサイトに挿入し、pEGFP-115TS vector、pEGFP-115mTS vectorを構築した(図6)。

次に、この2種類のベクター(pEGFP-115TS vector、pEGFP-115mTS)を制限酵素 Alw44Iにて切断しリニアにした後、エレクトロポレーション法にてAZ-521胃癌細胞に導入した。G418を含む選択培地で2週間以上培養した後、FACS解析によりEGFPを過剰発現する細胞株をそれぞれ樹立した(AG115TS、AG115mTS)。

- [0032] 2種類のhuman miRNA、miR-115:5' -UGAAGCGGAGCUGGAA- 3'、Let7e :5' -UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGU -3' を合成し(Japan Bio Service)、EGFPを発現する細胞株に対し、microRNA処理を行った。microRNA処理は、前日に6 well plateに細胞を蒔き、翌日2 μ Mの濃度のmiR-115、および Let7e をRNAiFect transfection reagent (QIAGEN) を用いて導入することで行った。24時間後に細胞を回収し、ウェスタンブロット法によりEGFPの発現レベルを解析した。

ウェスタンブロット解析は、以下の方法で行った。miR-115あるいはコントロールとして使用した Let7e で処理した細胞をSDS sample bufferに溶解し、タンパクをSDS-PAGEにて分離後、PVDFメンブレンに転写した。1次抗体に抗GFPモノクローナル抗体(Santa Cruz Biotechnology)、抗GAPDH抗体(Chemicon)を、2次抗体にALP conjugated antimouse 抗体(Santa Cruz Biotechnology)を用いてBCIP-NBT キットにて発色した。

- [0033] 以上の結果、miR115仮想標的配列(WT1遺伝子の終止コドン上流17塩基(2072nt - 2088nt)の3回繰り返し配列を挿入したGFPベクターをAZ-521細胞に発現させたAG115TS細胞においては、miR115処理によりGFPタンパクの発現が低下したが、let7e処理ではGFPタンパクの発現は変化しないことが明らかとなった。miR115仮想標的配列の5ヶ所に変異をもたせ、5回繰り返した塩基配列を挿入したGFPベクター

を、AZ-521細胞に発現させたAG115mTS細胞においては、miR115処理によってもGFPタンパクの発現は低下しないことが明らかとなった(図7)。これらの結果より、miR115は仮想標的配列を介してタンパク質の発現を抑制することが明らかとなった。

産業上の利用可能性

[0034] 本発明によって、WT1遺伝子の発現を効率的に抑制することができるマイクロRNAおよび該マイクロRNAを有効成分とする細胞増殖抑制剤が提供された。WT1遺伝子は、癌細胞に高発現することが知られていることから、本発明の細胞増殖抑制剤は、新規抗癌剤として特に有用である。また、これまでにWT1の過剰発現が、細胞の分化を抑制、またはアポトーシスを抑制することが知られている。このことより、本発明のmiR115によるWT1の発現抑制は、癌細胞において細胞分化の誘導、または細胞死の誘導を引き起こすものと考えられる。

請求の範囲

- [1] 以下の(a)から(c)のいずれかを有効成分として含有する、細胞増殖抑制剤。
 - (a) WT1遺伝子の転写産物に相補的な一本鎖RNA
 - (b) (a)のRNAをコードするDNA
 - (c) (b)のDNAが挿入されたベクター
- [2] 一本鎖RNAが、WT1遺伝子の転写産物における配列番号:1に記載の塩基配列に相補的である、請求項1に記載の細胞増殖抑制剤。
- [3] 一本鎖RNAが、配列番号:2に記載の塩基配列からなるRNAである、請求項1または2に記載の細胞増殖抑制剤
- [4] 以下の(a)から(c)のいずれかを有効成分として含有する細胞分化誘導剤または細胞死誘導剤。
 - (a) WT1遺伝子の転写産物に相補的なRNAと該RNAに相補的なRNAとを含む二重鎖RNA
 - (b) (a)の二重鎖RNAをコードするDNA
 - (c) (b)のDNAが挿入されたベクター
- [5] 一本鎖RNAが、WT1遺伝子の転写産物における配列番号:1に記載の塩基配列に相補的である、請求項4に記載の薬剤。
- [6] 一本鎖RNAが、配列番号:2に記載の塩基配列からなるRNAである、請求項4または5に記載の薬剤。

[図1]

ヒト miR-115

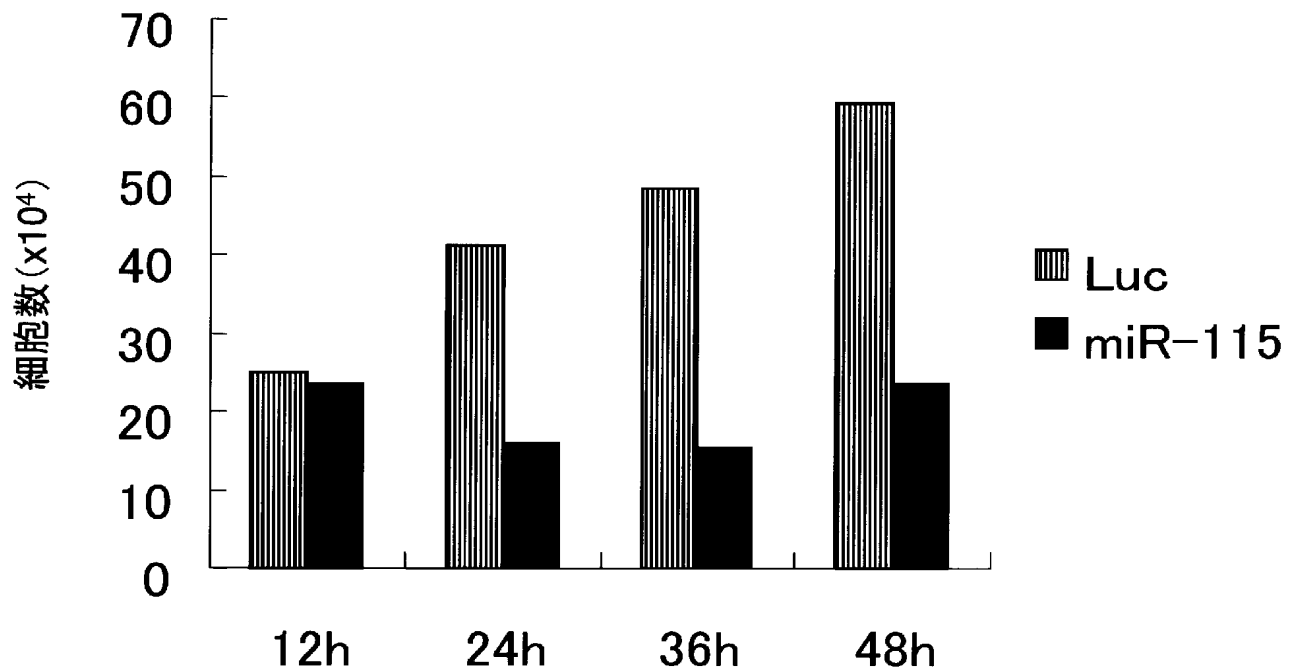
3'- **a**aggucga **g**gcgaagu -5'(配列番号:2)
 5'- **c**uccagcu gg**c**gcuuug -3'(配列番号:1)

WT1mRNA(1723 nt – 1739 nt)

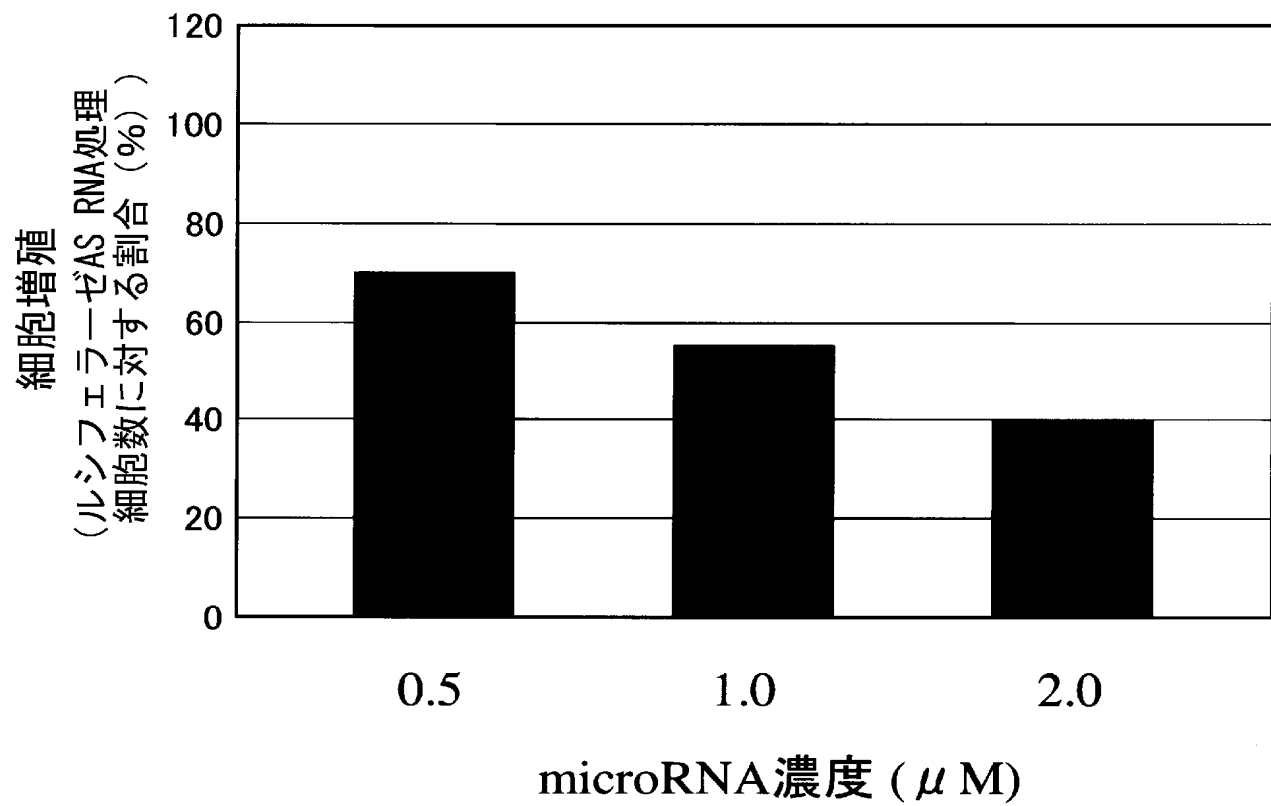
終止コドン

WT1mRNA(相補性 88%)

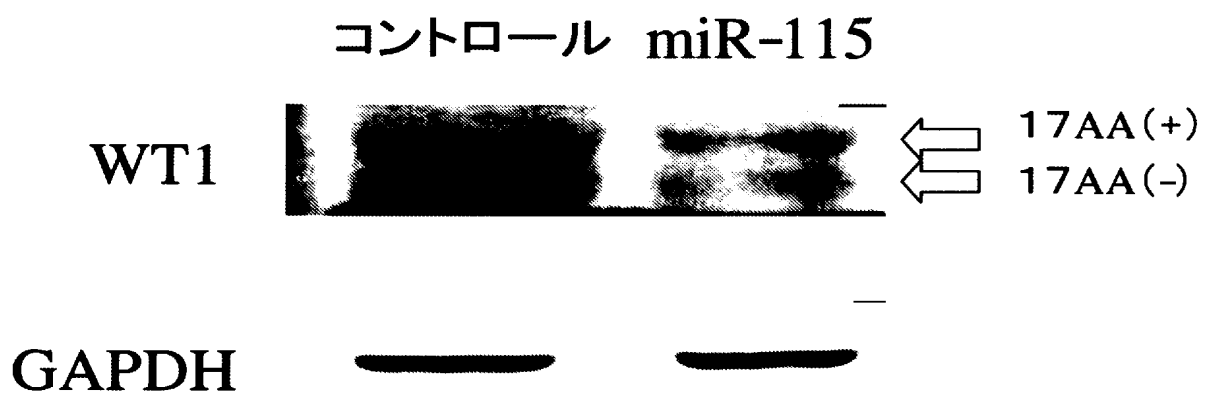
[図2]



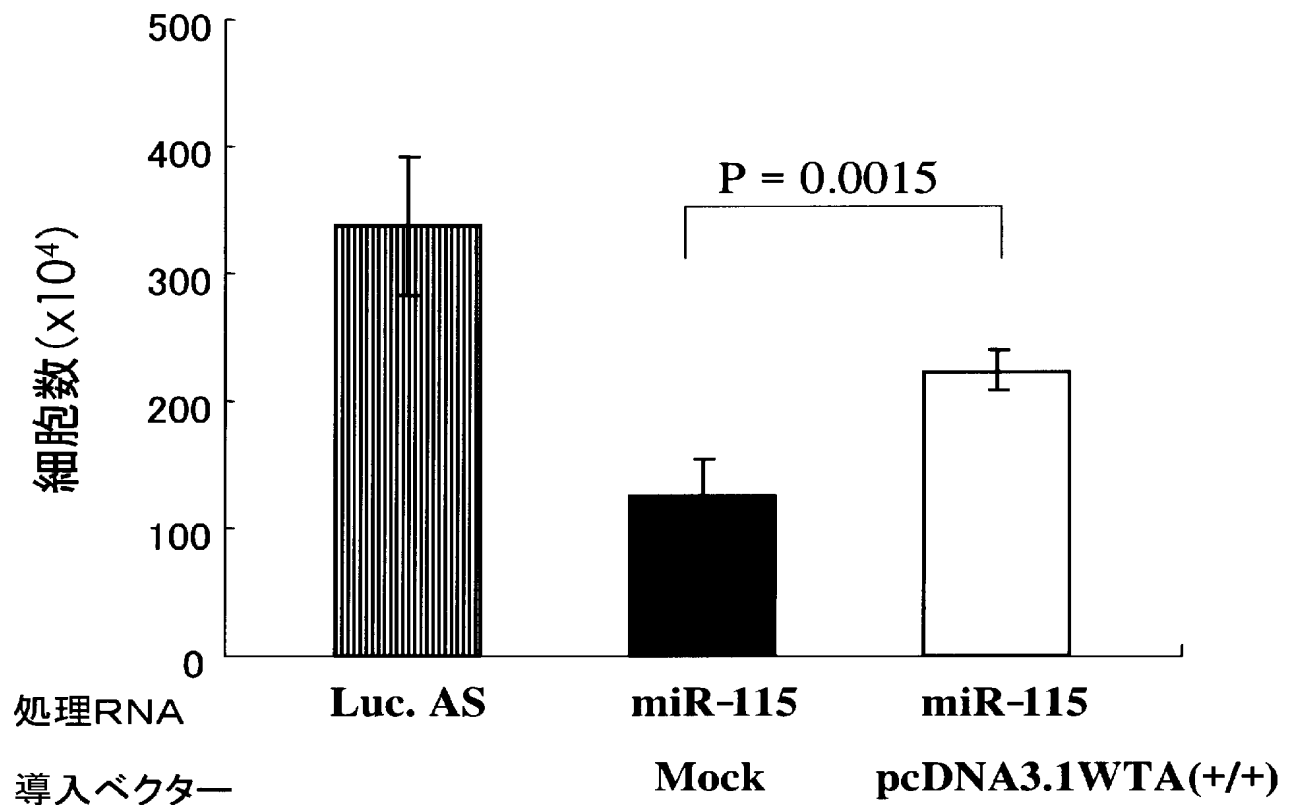
[図3]



[図4]



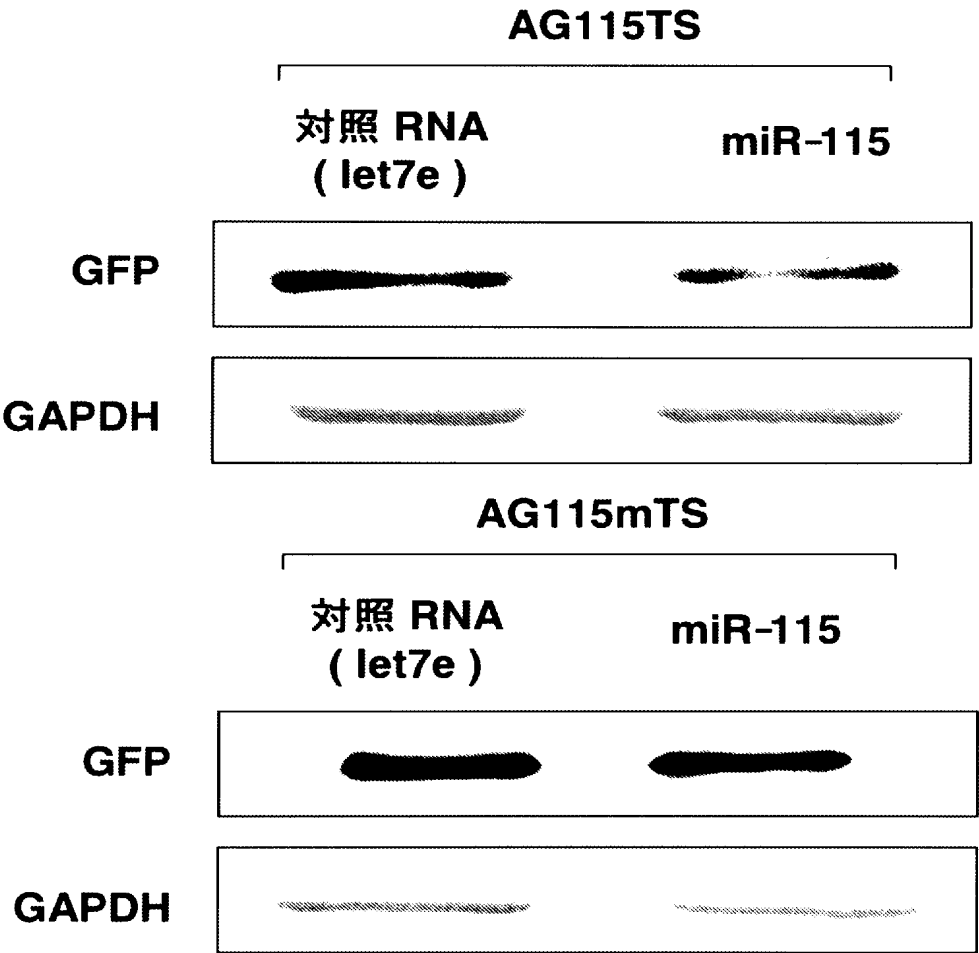
[図5]



[図6]



[図7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005790

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ A61K48/00, 31/7105, 31/711, 35/76, A61P35/00, 35/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ A61K48/00, 31/7105, 31/711, 35/76, A61P35/00, 35/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2005	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2005

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), EMBASE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	ELMAAGACLI, A.H. et al., WT1 and BCR-ABL specific small interfering RNA have additive effects in the induction of apoptosis in leukemic cells, Haematologica, 2005, Vol.90, No.3, pp326-34, full text, particularly, page 326, Abstract	1-6
X Y	YAMAGAMI, T. et al., Growth inhibition of human leukemic cells by WT1 (Wilms tumor gene) antisense oligodeoxynucleotides: implications for the involvement of WT1 in leukemogenesis, Blood, 1996, Vol.87, No.7, p.2878-84, full text, particularly, page 2878, Abstract	1, 4 2, 3, 5, 6

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 May, 2005 (18.05.05)

Date of mailing of the international search report

07 June, 2005 (07.06.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/005790

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 96/38176 A1 (Tadazo KISIMOTO), 05 December, 1996 (05.12.96), Full text; particularly, Claims 1 to 8 & EP 841068 A1	1, 4 2, 3, 5, 6
X Y	WO 99/3506 A1 (Haruo SUGIYAMA), 28 January, 1999 (28.01.99), Full text; particularly, Claims 1 to 13 & EP 1004319 A1	1, 4 2, 3, 5, 6
Y	Borkhardt A., Blocking oncogenes in malignant cells by RNA interference--new hope for a highly specific cancer treatment?, 2002, Vol.2, No.3, pp167-8, full text	1-6
A	MOURELATOS, Z. et al., miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs, Genes Dev, 2002, Vol.16, No.6, pp720-8	1-6
A	DAVIES, J.A. et al., Development of an siRNA-based method for repressing specific genes in renal organ culture and its use to show that the Wt1 tumour suppressor is required for nephron differentiation, Hum.Mol.Genet, 2004 Jan, Vol.13, No.2, pp235-46, full text	1-6
E,A	Morrison, Avril A. et al., A proteomic investigation of the role of WT-1 in disease, Biochemical Society Transactions, 2004 Aug, Vol.32, No.Part4, page 116A, full text	1-6

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ A61K48/00, 31/7105, 31/711, 35/76, A61P35/00, 35/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ A61K48/00, 31/7105, 31/711, 35/76, A61P35/00, 35/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN)	EMBASE (STN)
MEDLINE (STN)	
BIOSIS (STN)	

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P X	ELMAAGACLI, A. H. <i>et al</i> , WT1 and BCR-ABL specific small interfering RNA have additive effects in the induction of apoptosis in leukemic cells, Haematologica, 2005, Vol. 90, No. 3, pp326-34, 全文, 特に第 326 頁 Abstract	1-6
X Y	YAMAGAMI, T. <i>et al</i> , Growth inhibition of human leukemic cells by WT1 (Wilms tumor gene) antisense oligodeoxynucleotides: implications for the involvement of WT1 in leukemogenesis, Blood, 1996, Vol. 87, No. 7, p. 2878-84, 全文, 特に第 2878 頁	1, 4 2, 3, 5, 6

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

18.05.2005

国際調査報告の発送日

07.6.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

小堀 麻子

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

4C

2938

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	Abstract	
X Y	WO 96/38176 A1(岸本 忠三)1996. 12. 05, 全文, 特に請求項 1-8 & EP 841068 A1	1, 4 2, 3, 5, 6
X Y	WO 99/3506 A1(杉山 治夫)1999. 01. 28, 全文, 特に請求項 1-13 & EP 1004319 A1	1, 4 2, 3, 5, 6
Y	Borkhardt A., Blocking oncogenes in malignant cells by RNA interference—new hope for a highly specific cancer treatment?, 2002, Vol. 2, No. 3, pp167-8, 全文	1-6
A	MOURELATOS, Z. <i>et al</i> , miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs, Genes Dev, 2002, Vol. 16, No. 6, pp720-8	1-6
A	DAVIES, J. A. <i>et al</i> , Development of an siRNA-based method for repressing specific genes in renal organ culture and its use to show that the Wt1 tumour suppressor is required for nephron differentiation, Hum Mol Genet, 2004 Jan, Vol. 13, No. 2, pp235-46, 全文	1-6
E A	Morrison, Avril A. <i>et al</i> , A proteomic investigation of the role of WT-1 in disease, Biochemical Society Transactions, 2004 Aug, Vol. 32, No. Part4, p116A, 全文	1-6